

**Deteksi *Taura Syndrome Virus* (TSV) – Metode
*Quantitative (Real-Time) Reverse Transcription –
Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR)
menggunakan *Hydrolysis Probe***



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	3
6 Prosedur	3
7 Interpretasi hasil	6
8 Jaminan mutu pengujian.....	8
Bibliografi	9



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Taura Syndrome Virus* (TSV) – Metode *Quantitative (Real-Time) Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe*.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 21 November 2012 di Bogor, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, perguruan tinggi, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK).
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 11 Maret 2013 sampai 10 Mei 2013 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *Taura Syndrome Virus* (TSV) – Metode *Quantitative (Real-Time) Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe*

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Taura Syndrome Virus* (TSV) dengan metode *quantitative (Real-Time) Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe*.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini digunakan.

2.1

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro*

2.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.3

Cq (quantification cycle)/ Ct (cycle threshold)/ Cp (crossing point)

titik perpotongan antara kurva amplifikasi kontrol negatif dengan sampel atau titik awal terjadinya kenaikan kurva amplifikasi

2.4

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.5

ekstension

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal

2.6

hydrolysis probe

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang dilabel dengan sebuah *fluorophore* secara kovalen pada ujung 5' dan sebuah *quencher* pada ujung 3' yang akan berpendar ketika terjadi proses amplifikasi

2.7

kontrol positif amplifikasi

hasil transkripsi *in vitro* plasmid rekombinan yang mengandung fragmen gen virus

2.8

kontrol negatif amplifikasi

nuclease-free water yang diperlakukan sama dengan hasil ekstraksi contoh uji

2.9

kontrol negatif ekstraksi

hasil ekstraksi yang berasal dari *nuclease-free water*

2.10

kontrol positif ekstraksi

hasil ekstraksi yang berasal dari organ atau contoh uji yang terinfeksi

2.11

Limit of Detection (LOD)

jumlah *copy* atau molekul target terendah yang masih dapat dideteksi dengan tingkat kepercayaan 95%

2.12

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.13

real-time PCR

suatu teknik PCR dengan metode analisa yang secara simultan dapat diamati hasil amplifikasinya

2.14

Reverse Transcription (RT)

proses pembentukan DNA komplemen dari RNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*

2.15

standar positif

plasmid yang mengandung cDNA virus yang diketahui jumlah *copy*nya

2.16

template

sekuen cDNA/RNA tertentu yang akan diamplifikasi

3 Prinsip umum

Prinsip dari metode ini adalah mengisolasi dan memurnikan RNA dari organ target/ jaringan yang diduga terinfeksi TSV, dilanjutkan dengan transkripsi balik untuk mensintesis cDNA yang seterusnya diamplifikasi secara *real-time*.

4 Peralatan

- a) alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis UV *Spectrophotometry*;
- b) *freezer* (suhu -20 °C atau lebih rendah);
- c) *heating block* atau *waterbath*;
- d) *laminar air flow*;
- e) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- f) pinset dan gunting;
- g) *rack ice block*;
- h) *refrigerated centrifuge*;
- i) *spindown centrifuge*;

- j) satu paket mesin *real-time* PCR;
- k) *minimixer*.

5 Bahan

- a) β -mercaptoethanol;
- b) *diethyl pyro carbonate* (DEPC) *treated water* atau RNase/ *nuclease-free water*;
- c) *ethanol* p.a;
- d) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 μ l – 1 000 μ l;
- e) *First Strand cDNA Synthesis Kit*;
- f) *isopropanol* (2-propanol);
- g) kit ekstraksi RNA dengan metode *spin column*;
- h) *kit real-time* PCR komersial *compatible* dengan *TaqMan*[®] *probe*;
- i) kloroform;
- j) larutan ekstraksi RNA komersial;
- k) larutan preservatif RNA;
- l) masker;
- m) *microtube* ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml;
- n) *pellet pestle*/penggerus jaringan;
- o) plasmid kontrol positif TSV;
- p) RNase *inhibitor*;
- q) sarung tangan (*powder-free*);
- r) tabung atau *microplate* PCR optikal ukuran 0,1 ml - 0,2 ml atau tabung kapiler ukuran 20 μ l - 100 μ l;
- s) TN Buffer (20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl pH 7.4);
- t) Tris EDTA (TE) *buffer* (konsentrasi 10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 7.5);
- u) 1 set primer spesifik dan *probe*
 - TSV1004F : 5'-TTG GGC ACC AAA CGA CAT T-3'
 - TSV1075R : 5'-GGG AGC TTA AAC TGG ACA CAC TGT-3'
 - TSVp1 : 5'-FAM- CAG CAC TGA CGC ACA ATA TTC GAG CAT C-TAMRA-3'

CATATAN 1 bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan

CATATAN 2 bisa menggunakan primer dan *TaqMan*[®] *probe* lainnya yang sudah tervalidasi dan sudah diverifikasi di laboratorium

6 Prosedur

6.1 Persiapan contoh uji

- a. Telur, larva dan *pasca larva*
Contoh dapat diambil dari seluruh tubuh udang.
- b. Juvenil sampai dewasa
Contoh dapat diambil dari organ limfoid, *pleopod* atau *haemolymph* baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan gliserol dan *ethanol* absolut dengan perbandingan 20 : 80 atau RNA *latter*.

6.2 Ekstraksi RNA

6.2.1 Metode presipitasi

- a) masukkan 2 mg - 5 mg contoh uji ke dalam *microtube* 1,5 ml.

- b) tambahkan 500 µl larutan ekstraksi RNA komersial, homogenkan menggunakan *pellet pastle*.
- c) inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.
- d) tambahkan 100 µl kloroform.
- e) tutup *microtube* dan kocok dengan *minimixer* selama 15 detik dan inkubasi pada suhu ruang selama 3 menit.
- f) sentrifugasi contoh pada 12 000 rpm selama 15 menit.
- g) pindahkan cairan lapisan paling atas (fase air) ke dalam *microtube* baru.
- h) tambahkan *isopropanol* sebanyak 200 µl.
- i) sentrifugasi pada 12 000 rpm selama 10 menit.
- j) buang *isopropanol*, cuci *pellet* dengan 750 µl *ethanol* 75%, sentrifugasi pada 9 500 rpm selama 5 menit.
- k) keringanginkan *pellet* RNA selama 10 menit.
- l) larutkan *pellet* RNA dengan 100 µl DEPC water.
- m) ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi RNA dengan menggunakan rumus :

$$\text{Konsentrasi RNA} = A_{260} \times 40 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- n) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan.
- o) periksa kemurnian RNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}).
- p) simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada *freezer* dengan suhu yang lebih rendah dalam bentuk *aliquot*.

6.2.2 Metode *spin column*

- a) masukkan 20 mg – 25 mg contoh uji ke dalam *microtube* 1,5 ml
- b) tambahkan 400 µl *lysis/binding buffer* dan homogenkan
- c) sentrifugasi pada 13 000 x g selama 2 menit
- d) pindahkan cairan supernatan ke dalam *microtube* 1,5 ml yang baru
- e) tambahkan 200 µl *ethanol* 96%
- f) pindahkan seluruh larutan tersebut ke dalam *filter tube* dengan *collection tube* yang telah dikombinasikan.
- g) sentrifugasi pada 13 000 x g selama 30 detik.
- h) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*
- i) masukkan 90 µl DNase *incubation buffer* (*white cap*) ke dalam *microtube* 1,5 ml steril dan tambahkan 10 µl larutan DNase I
- j) masukkan campuran larutan no. i) ke dalam *filter tube*
- k) inkubasikan selama 15 menit pada suhu 15 °C – 25 °C
- l) tambahkan 500 µl *wash buffer* I (*black cap*) ke dalam *filter tube*
- m) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 15 detik
- n) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*
- o) tambahkan 500 µl *wash buffer* II (*blue cap*) ke dalam *filter tube*
- p) ulangi langkah no. m) sampai dengan no. n)
- q) tambahkan 300 µl *wash buffer* II (*blue cap*) ke dalam *filter tube*
- r) sentrifugasi pada 13 000 x g selama 2 menit

- s) pisahkan secara hati-hati *filter tube* dari *collection tube* agar *filter tube* tidak bersinggungan dengan larutan hasil sentrifugasi yang mengandung ethanol
- t) pasang *filter tube* dengan *microtube* 1,5 ml steril (*nuclease-free*)
- u) tambahkan 100 μ l *elution buffer* ke dalam *filter tube*
- v) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit. Hasil sentrifugasi yang terdapat pada *microtube* merupakan RNA murni.
- w) ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi RNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi RNA} = A_{260} \times 40 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- x) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan.
- y) periksa kemurnian rna dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}).
- z) simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada *freezer* dengan suhu yang lebih rendah dalam bentuk *aliquot*.

CATATAN 1 prosedur metode presipitasi menggunakan kit komersial

CATATAN 2 prosedur metode *spin column* menggunakan kit komersial

CATATAN 3 ekstraksi RNA juga dapat menggunakan kit komersial lainnya

6.3 Sintesis cDNA dan amplifikasi

6.3.1 Sintesis cDNA

- a) panaskan RNA hasil ekstraksi (*template*) pada suhu 100 °C selama 5 menit kemudian masukkan ke dalam es.
- b) buat preparasi *cocktail first strand cDNA synthesis* sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *cocktail* 10 % lebih banyak dari yang dibutuhkan. Contoh uji yang dianalisa *duplo* minimal 5% dari total contoh uji.
- c) distribusikan 18 μ l *cocktail* tersebut pada *microtube* ukuran 0,2 ml.
- d) masukkan 2 μ l *template* RNA (10 ng - 100 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi dan kontrol positif amplifikasi (RNA).
- e) inkubasikan pada 60 °C selama 30 menit.

Tabel 1 – Komposisi cocktail first strand cDNA synthesis

No	Nama Bahan	Volume (μ l)
1	<i>Random hexamer</i>	1
2	<i>Nuclease free water</i>	10
3	<i>RNase inhibitor</i>	0,5
4	<i>Reverse Transcription buffer</i>	4
5	dNTP	2
6	<i>Reverse transcriptase</i> 20 u/ μ l	0,5
Total		18
CATATAN 1 Protokol di atas menggunakan transkriptor <i>first strand cDNA synthesis kit</i>		
CATATAN 2 Sintesis cDNA juga dapat menggunakan reagen sejenis lainnya sesuai protokol yang dianjurkan		

6.3.2 Proses amplifikasi

- cairkan cDNA, *primer*, *probe*, PCR *master mix*, *nuclease-free water*, dan letakkan di atas es.
- buat preparasi *cocktail* amplifikasi sesuai dengan Tabel 2. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan.
- homogenkan semua bahan *cocktail* amplifikasi dan distribusikan ke masing-masing tabung/ *microplate*/ kapiler PCR optikal.
- masukkan 5 µl template cDNA contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi, kontrol positif amplifikasi; kontrol negatif amplifikasi (NTC); dan 4 standar positif (10^1 copies; 10^2 copies; 10^3 copies; 10^4 copies).
- lakukan amplifikasi dengan *real-time* RT-qPCR, dengan kondisi sesuai Tabel 3.

CATATAN seluruh proses *preparasi* reagen dilakukan pada kondisi dingin.

Tabel 2 – Komposisi *cocktail* amplifikasi *real-time* PCR TSV

No	Nama Bahan	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
1	<i>Nuclease-free water</i>	8,5	
2	<i>Master Mix</i> LC Taq man master 5x <i>Concentration</i>	4	1 x
3	TSV1004F <i>primer</i> (10 µM)	1	0,5 µM
4	TSV1075R <i>primer</i> (10 µM)	1	0,5 µM
5	TSVp1 <i>probe</i> (10 µM)	0,5	0,25 µM
Total		15	
CATATAN komposisi <i>cocktail</i> disesuaikan dengan manual kit yang digunakan			

Tabel 3 - Profil amplifikasi

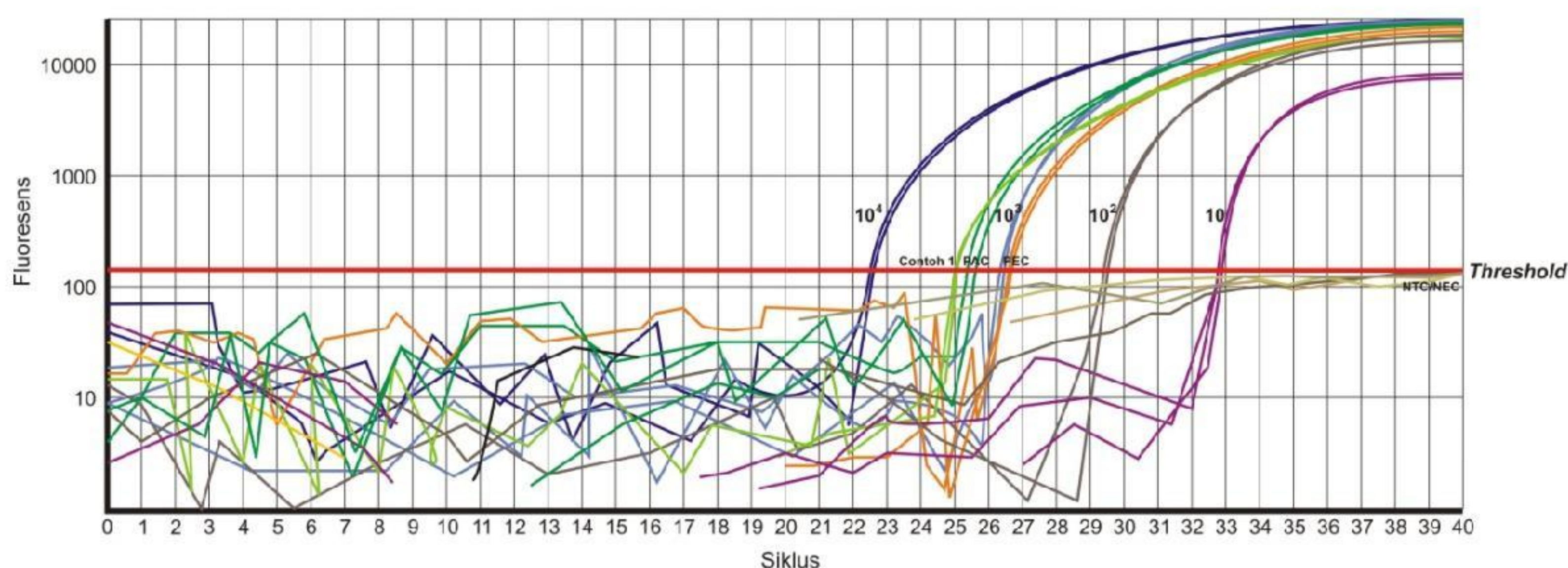
Proses		Suhu (°C)	Waktu	Siklus	Mode analisis	Mode akuisisi
<i>Hot Start</i>		95	10 menit	1	-	-
Amplifikasi	Denaturasi	95	15 detik	40	Kuantifikasi	-
	<i>Annealing</i> dan Ekstensi	60	1 menit			<i>Single</i>
<i>Cooling</i>		40	30 detik	1	-	-
CATATAN profil amplifikasi disesuaikan dengan manual kit dan mesin <i>real-time</i> PCR yang digunakan						

7 Interpretasi hasil

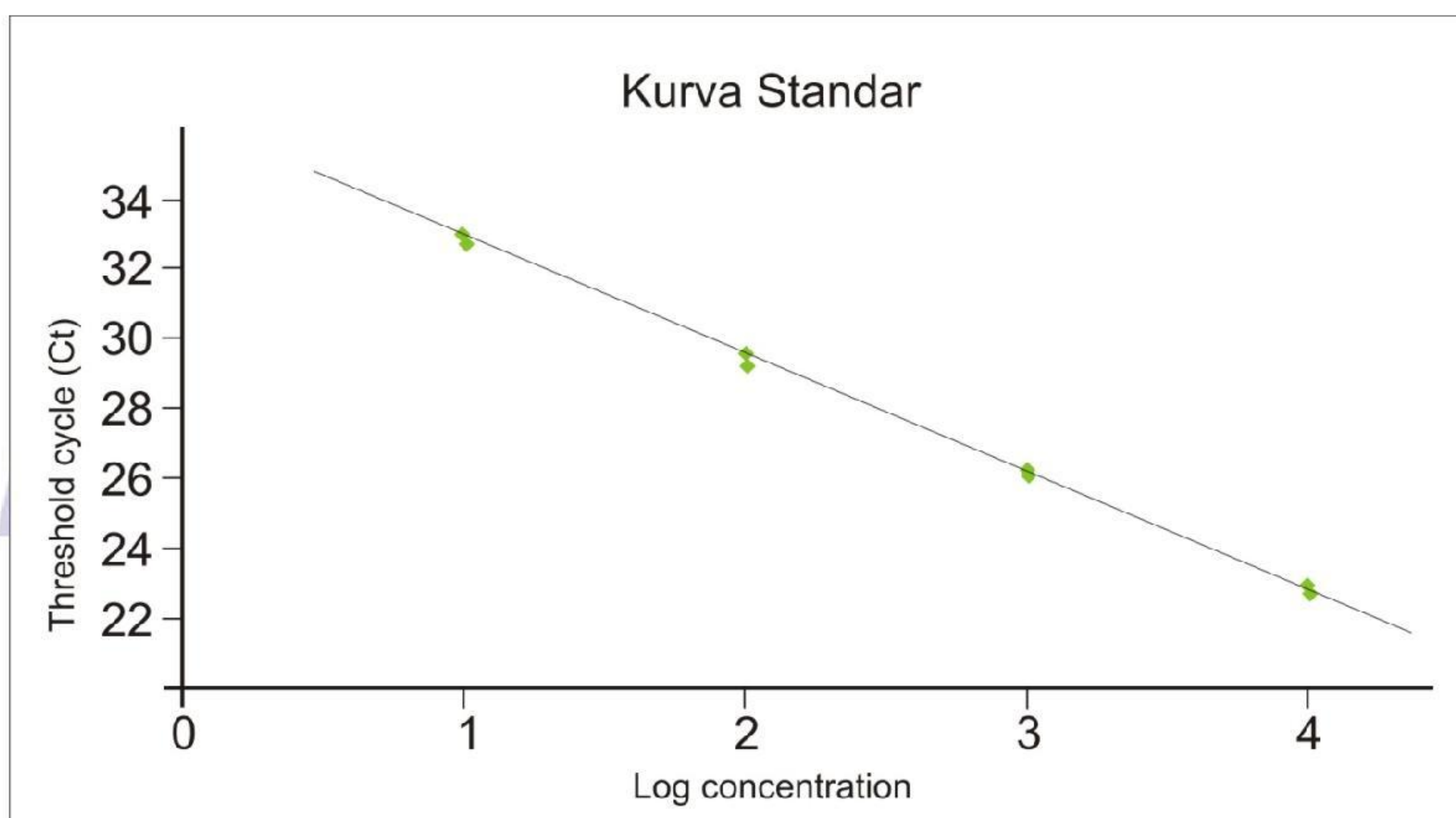
Lakukan analisis data sesuai dengan *software real-time cycler* yang digunakan.

- Pengamatan selama proses *real-time* RT-qPCR:

KURVA AMPLIFIKASI



Gambar 1 – Contoh kurva amplifikasi



Gambar 2 – Contoh kurva standar

Interpretasi kurva *amplifikasi real-time* PCR adalah sebagai berikut:

- *Threshold/ cut off* ditentukan dengan menarik garis datar yang berada di atas perpotongan antara *No Template Control* (NTC) dan kontrol negatif ekstraksi dengan kontrol positif ekstraksi dan kontrol positif amplifikasi.
- Contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/ cut off* dan nilai *Cq* lebih kecil atau sama dengan LOD.
- Contoh uji dinyatakan negatif apabila berada dibawah garis *threshold/ cut off* dan nilai *Cq* lebih besar dari LOD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95%.

b) Kuantifikasi *copy* virus

Jumlah *copy* virus dapat dilihat pada tabel laporan kuantifikasi di perangkat lunak komputer yang terhubung dengan mesin *real-time* PCR yang digunakan. Nilai positif akan terlihat dari nilai konsentrasi pada angka tertentu.

Tabel 3 - Contoh laporan hasil kuantifikasi *copy* virus

No.	Nama	Tipe	Cq	Konsentrasi	Standar
1	Kontrol negatif ekstraksi	Unknown	-	-	-
2	Kontrol negatif ekstraksi	Unknown	-	-	-
3	Kontrol negatif amplifikasi	Unknown	-	-	-
4	Kontrol negatif amplifikasi	Unknown	-	-	-
5	Kontrol positif ekstraksi	Unknown	25,69	2,10E+03	-
6	Kontrol positif ekstraksi	Unknown	25,33	2,13E+03	-
7	Kontrol positif amplifikasi	Unknown	26,85	1,70E+03	-
8	Kontrol positif amplifikasi	Unknown	26,82	1,72E+03	-
9	Standar 10 ¹	Standard	32,76	1,74E+01	2,03E+01
10	Standar 10 ¹	Standard	32,91	1,73E+01	2,03E+01
11	Standar 10 ²	Standard	29,48	1,93E+02	2,03E+02
12	Standar 10 ²	Standard	29,66	1,92E+02	2,03E+02
13	Standar 10 ³	Standard	26,18	2,06E+03	2,03E+03
14	Standar 10 ³	Standard	26,46	1,72E+03	2,03E+03
15	Standar 10 ⁴	Standard	22,78	1,86E+04	2,03E+04
16	Standar 10 ⁴	Standard	22,55	1,17E+04	2,03E+04
17	Contoh uji 1	Unknown	24,99	1,96E+03	-
18	Contoh uji 1	Unknown	25,21	1,94E+03	-
19	Contoh uji 2	Unknown	> 40,00	-	-
20	Contoh uji 2	Unknown	> 40,00	-	-

8 Jaminan mutu pengujian

- Proses ekstraksi DNA dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif ekstraksi (PEC) dan kontrol negatif ekstraksi (NEC) atau dengan menggunakan *reference gen* dan menunjukkan hasil yang konsisten.
- Hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ berkisar 1,8 – 2,1.
- Proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif amplifikasi (PAC) dan kontrol negatif amplifikasi (NAC) serta menunjukkan hasil yang konsisten.
- Efisiensi amplifikasi dinyatakan baik apabila mempunyai nilai *slope* -3,10 sampai dengan -3,58.
- Proses *real-time* PCR valid bila dilihat dari kurva standar yang nilai koefisien determinasi (R^2) > 0,985.
- Keterulangan (*repeatability*) untuk pengujian duplo harus mempunyai nilai Standar Deviasi (SD) Cq < 0,5.

Bibliografi

Nugen. 2011. *Manual Procedure Nugen PCR Detection Kit*.

Nunan LM, Tang-Nelson K, Lightner DV. 2004. Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura syndrome virus. *Aquaculture* 229 (2004) 1-10.

OIE. 2009. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Chapter 2.2.4.

Roche. 2004. *LightCycler® TaqMan Master Instruction Manual*.

Roche. 2010. *Manual Procedure of High Pure RNA Tissue Kit*.

